

題目 培養歯髄細胞におけるテネインの発現と機能に及ぼす成長因子の影響

著者 堀部ますみ

内容要旨

器官発生において上皮と間葉組織との相互作用は必須であり、その相互作用は発生段階で分泌される成長因子の作用を介した細胞外基質(ECM)の発現に依存して起こると考えられている。とりわけ ECM 蛋白のうちテネイン(TN)は細胞の接着機能を調節することにより組織の構築に関与している。歯髄の原形である歯胚の間葉組織においても発生段階で TN の発現が変動することが知られているが、成長因子による TN 発現の変動に伴う機能調節やその機構に関する情報は少ない。本研究では、培養歯髄細胞における TN の発現および発現に及ぼす成長因子の影響を調べるとともに、細胞接着機能との関連ならびに成長因子による接着機能への影響も調べることによって、TN の歯髄組織における上皮間葉相互作用および形態形成における役割を検討した。細胞はラット株化歯髄細胞 RPC-C2A 細胞を用いた。始めに、RPC-C2A 細胞の *in vitro* における増殖動態を測定し、その結果をもとに以下の系に従って実験を行った。細胞は 10% FBS 添加 EMEM 培地で 48 時間培養し、無血清培地で 12 時間の前培養を行った後、1% BSA を含む培地に成長因子を添加し、さらに 24 時間培養した。細胞刺激に用いた成長因子は transforming growth factor β 1(TGF- β), basic fibroblast growth factor (bFGF), epidermal growth factor (EGF), hepatocyte growth factor (HGF), retinoic acid (RA) とした。刺激した細胞から total RNA および蛋白を回収し、TN およびフィブロネクチン(FN) mRNA の発現を RT-PCR 法、また TN 蛋白の発現をウェスタンブロット法にてそれぞれ調べた。さらに、成長因子の細胞接着に及ぼす影響を検討するために、細胞接着分析を行った。すなわち、成長因子で刺激した細胞を FN で表面処理した培養ディッシュに播種し、2 時間後の接着細胞数を位相差顕微鏡観察により算出した。また、成長因子で刺激した細胞を抗 TN 抗体(anti TN)に反応させて TN の機能を阻害した後、同様の実験を行った。TN mRNA の発現は、対照群に比べて TGF- β , HGF, RA で刺激した細胞では増強していたが、bFGF, EGF で刺激した細胞では変化がなかった。また、TN 蛋白の発現も mRNA と同様の結果が得られた。FN mRNA の発現はどの成長因子で刺激しても変化はなかった。FN に対する接着細胞数は TGF- β , HGF, RA 刺激で対照群と比べて少なく、bFGF, EGF においては対照群とほぼ同数であった。すなわち、TGF- β , HGF, RA 刺激した細胞では、TN の発現が亢進する一方で、細胞接着が阻害されていた。このことから TN が細胞接着を阻害している可能性が示された。さらに、anti TN で処理した場合、接着細胞数はいずれの成長因子で刺激した場合も一様にほぼ同数にまで回復した。これらの結果から、TN が RPC-C2A 細胞と FN の接着に対して阻害機能を有しており、抗体によってそれが遮蔽されることが明らかとなった。以上のことから、歯髄細胞の TN 発現は成長因子により制御されており、歯髄組織において TN は FN と拮抗して細胞接着を阻害し、成長因子による TN 発現の増減を介して細胞接着が調節されていることが示唆された。

培養歯髄細胞におけるテネシンの発現と
機能に及ぼす成長因子の影響

堀部ますみ

Effects of Growth Factors on Tenascin Expression and
its Function in Cultured Dental Pulp Cells

Masumi HORIBE

徳島大学大学院歯学研究科

歯科保存学第二講座

(指導：永田俊彦)

Department of Periodontology and Endodontology,

Tokushima University School of Dentistry

(Supervisor : Prof. Toshihiko NAGATA, D.D.S.,ph.D.)

培養歯髓細胞におけるテネシンの発現と
機能に及ぼす成長因子の影響

堀部ますみ

Effects of Growth Factors on Tenascin Expression and
its Function in Cultured Dental Pulp Cells

Masumi HORIBE

徳島大学大学院歯学研究科

歯科保存学第二講座

(指導：永田俊彦)

Department of Periodontology and Endodontology,

Tokushima University School of Dentistry

(Supervisor : Prof. Toshihiko NAGATA, D.D.S.,ph.D.)

論文表題 培養歯髄細胞におけるテネインの発現と
機能に及ぼす成長因子の影響

著者名 堀部ますみ

所属 徳島大学大学院歯学研究科歯科保存学第二講座

キーワード 歯髄細胞, テネイン, 細胞接着, 成長因子

①学位論文

②原稿総枚数 本文 32 枚 (表題 1 枚, 本文 18 枚, 文献 8 枚, 図の説明 3 枚, 英文抄録 2 枚)

図 4 枚 (図 1, 図 2-B, 図 5-B, 図 6-B)

写真 5 枚 (図 2-A, 図 3, 図 4, 図 5-A, 図 6-A)

表 1 枚

③別刷希望数 50 部

④連絡先 堀部ますみ

(所属) 徳島大学歯学部歯科保存学第二講座

電話 (088)633-7344

内線 5262

緒言

歯の発生過程を組織学的に観察すると、まず、外胚葉由来の歯提から上皮組織の肥厚が起こり、続いて、間葉系細胞が上皮肥厚部周囲へ凝集し、最後に上皮の分岐および伸長が起こる結果、歯胚に特異的な形態が形成される¹⁾。歯胚の器官培養実験においては、大白歯の歯胚上皮と前歯の歯乳頭を接触させると歯胚は前歯の形態を呈し²⁾、さらに、歯胚の間葉組織と発生期の足の上皮を接触させると足の上皮が歯胚上皮様の構造に変化することが明らかにされている³⁾。これらの事実から、歯胚の形態形成では、間葉組織の制御の下で上皮組織と間葉組織の相互作用（上皮間葉相互作用）が必須であると理解されている⁴⁾。一方、この上皮間葉相互作用は、器官発生過程で分泌される成長因子の作用を介した細胞外基質（ECM）の発現ならびに細胞とECMの接着機能の調節に依存している¹⁾。また、その接着機能にはテネイシン（TN）、フィブロネクチン（FN）、ビトロネクチン、トロネロポンジンなどの接着性ECMが関与していることが明らかにされている^{5,6,7)}。これら接着性ECMのうち、TNやFNは歯髓の原形となる間葉組織あるいは歯乳頭に限局して発現し、発生段階において発現時期や部位が一定しているFNに比べて、TNは発現は大きく変動する^{6,8)}。また、機能面からの詳細な検討により、TNはFNによる細胞の接着作用に対して阻害的に作用することによって抗接着機能を発揮することが明らかにされている^{9,10)}。

歯胚における成長因子の発現および作用に関して、これまでに以下に示すような多くの知見が得られている。1) transforming growth factor β 1 (TGF- β) は間葉組織に発現しており、

その発現部位は TN および FN の発現部位と相同している^{8,11)}。また、歯胚の間葉組織と口腔粘膜由来の上皮を接触させた場合、TGF- β の発現が誘導される¹²⁾。2) basic fibroblast growth factor (bFGF) の受容体は上皮組織と間葉組織に存在し、さらに bFGF は間葉系細胞の増殖を促す¹³⁾。3) epidermal growth factor (EGF) は上皮組織と間葉組織に発現がみられ¹⁴⁾、上皮細胞と間葉系細胞の増殖を制御することで形態形成に関与している¹⁵⁾。4) hepatocyte growth factor (HGF) は歯乳頭に発現しており^{16,17)}、そのアンチセンスオリゴヌクレオチド処理によって歯胚の形態が異常になる¹⁷⁾。5) ビタミン A 過剰症のマウスでは切歯と臼歯の癒合や切歯の過剰形成がみられ^{18,19)}、retinoic acid (RA) に特異的に結合する RA-binding protein I が間葉組織に強く発現している²⁰⁾。以上に示したような報告から、TGF- β などの種々の成長因子が歯胚における上皮間葉相互作用ならびに形態形成に深く関与していることが明らかであると考えられる。しかしながら、このような多くの知見の中で、歯の発生過程での成長因子の作用を介した TN 発現の変動、およびそれに伴う上皮間葉相互作用、さらに TN 発現に関わる分子機構などについての詳細な情報は得られていない。

本研究では、歯髓細胞の TN 発現に及ぼす成長因子の影響を調べるとともに、成長因子の細胞接着機能に及ぼす効果を検索することによって、TN の歯胚間葉組織における上皮間葉相互作用および形態形成における役割を追究した。実験では、培養歯髓細胞を用いた *in vitro* の系における、種々の成長因子 (TGF- β , bFGF, EGF, HGF, RA) による TN および FN 発現への影響、さらに、それらの成長因子が TN の細胞接着作用に及ぼす影響について検討した。

材料および方法

1. 材料

ウィスター系ラット歯髄由来細胞株である RPC-C2A 細胞は、東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科・春日井昇平教授より供与された。Cell Proliferation Kit I (MTT) および 5-Bromo-2'-deoxy-uridine Labeling and Detection Kit III (BrdU) は、ともに Roche Molecular Biochemicals (Mannheim, Germany) より購入した。培養細胞の培地に添加した成長因子は、Recombinant human transforming growth factor β 1 (TGF- β ; Roche Molecular Biochemicals), Recombinant human basic fibroblast growth factor (bFGF; R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA), Recombinant human epidermal growth factor (EGF; R&D Systems Inc.), Recombinant human hepatocyte growth factor (HGF; R&D Systems Inc.), Retinoic acid (RA; SIGMA) の 5 種類を用いた。ウェスタンブロッティング用一次抗体として用いた抗 TN マウスモノクローナル抗体は、三重大学医学部・吉田利通教授より供与された。二次抗体として Horseradish peroxidase (HRP) 酵素標識抗マウス Ig 抗体 (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK) を、TN の機能阻害用抗体として抗ニワトリ TN ウサギ抗血清 (抗 TN 抗体; Chemicon International, Inc., Temecula, CA, USA) を用いた。培養ディッシュのコーティングには、精製 FN [Fibronectin (pure); Roche Molecular Biochemicals] およびウシ血清アルブミン (BSA ; Sigma, St. Louis, MO, USA) を用いた。なお、RPC-C2A 細胞に対する各抗体の交叉性に関しては、予備実験においてそれぞれの抗体が適切に反応することを確認した。

2. 細胞培養

RPC-C2A 細胞は, Kasugai らの方法²¹⁾を参考に, 10% ウシ胎児血清 (FBS; JRH Biosciences, Lenexa, KS, USA) および 0.292 g/l L-グルタミンを含む EMEM 培地 (日水製薬, 東京) を用い, 37°C, 5% CO₂, 95% 気相の条件下で培養した。培地交換は 2 日毎に行った。なお, 成長因子で処理する際や細胞接着分析を行う際には, 50 µg/ml アスコルビン酸 (和光純薬, 大阪) を添加した 10% FBS 含有 EMEM 培地, あるいは 1% BSA を添加した DMEM/F-12 1:1 mixture 培地 (DMEM/F-12; Sigma) を用いた。

3. 細胞増殖分析

実験に先立ち, RPC-C2A 細胞のミトコンドリア呼吸鎖活性, DNA 合成能および細胞数の測定を行うことにより, 培養細胞の増殖に関する検定を行った。ミトコンドリア呼吸鎖活性は, Cell Proliferation Kit I (MTT), DNA 合成能は, 5-Bromo-2'-deoxy-uridine Labeling and Detection Kit III (BrdU) を用いてそれぞれの使用説明書に従った手順で測定した。すなわち, 96 well プレート (MS-8096F; 住友ベークライト, 東京) に 10% FBS 含有 EMEM で懸濁した細胞を 2.2×10^4 個/well の密度で播種し, MTT は 4 時間, BrdU は 2 時間反応させそれぞれの発色基質に特異的な吸収波長における吸光度を測定した。吸収波長はミトコンドリア呼吸鎖活性については 595 nm, DNA 合成については 405 nm で測定し, 培養開始から 144 時間まで 24 時間間隔で実験を行った。一方, 細胞数を測定する場合は, 直径 6cm の培養ディッシュ (MS-11600; 住友ベークライト) に 10% FBS 含有 EMEM で懸濁した細胞 1.4×10^5 個を播種し, 培養開始から 156 時間まで測定を行った。すなわち, 培養後の細胞

をリン酸緩衝生理食塩水: Phosphate buffered saline [PBS(-) ; 日水製薬] で洗浄し, 0.05% Trypsin/0.53 mM EDTA 4Na 溶液 (GIBCO BRL, Rockville, MD, USA) で培養ディッシュから剥離・拡散させた後, Counting chamber (エルマ光学, 東京) を用いて細胞数をカウントした。

4. 成長因子による細胞処理

RPC-C2A 細胞を 6.8×10^3 個/cm² の密度で直径 9 cm の培養ディッシュ (MS-13900; 住友ベークライト) に播種し, 10% FBS 含有 EMEM で 48 時間培養した後, 無血清培地用培地 DMEM/F-12 による前培養を 12 時間行った。引き続き, 培地を 1% BSA 含有 DMEM/F-12 に交換する際に成長因子を添加し, さらに 24 時間培養した。なお, 添加した成長因子の濃度は, 予備実験にて RPC-C2A 細胞の増殖が最も促進される濃度を選び, TGF- β , bFGF, EGF, HGF はそれぞれ 10 ng/ml, RA は 10^{-6} M とした。また, 対照群として, 成長因子を添加しない群 (コントロール) と, 10% FBS 含有 EMEM で培養する群 (10% FBS EMEM) を設定し, それぞれ RNA および蛋白回収用試料とした。

5. TN および FN の mRNA の検出

成長因子で処理した細胞が発現する TN および FN の mRNA は, reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR 法)²²⁾ によって増幅して得た cDNA を電気泳動し, エチジウムブロマイド (Sigma) で染色して検出した。以下にその手順を示す。

- 1) complementary DNA (cDNA) の調製: 成長因子で処理した細胞から Chomczynski ら

の方法²³⁾に基づき RNA Isolation Kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA) を用いてグアニジンチオシアネート・フェノール・クロロホルム法によって total RNA を抽出した。total RNA のうち 1 µg を室温で 10 分間 DNase I (GIBCO BRL) によって処理した後, 25 mM EDTA を添加し, 65°C, 10 分間の処理で酵素失活処理を行った。total RNA に含まれる mRNA から cDNA への変換は, Nakayama らの方法²²⁾に従い, cDNA Synthesis Kit (Life Sciences, INC., St. Petersburg, FL, USA) に付属の AMV Reverse Transcriptase と Oligo (dT)₁₂₋₁₈ Primer を用いた逆転写反応によって行った。

2) cDNA の増幅: cDNA の増幅は, 目的とする cDNA の特定部位に相補的に結合するプライマーと耐熱性の DNA ポリメラーゼ AmpliTaq Gold (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, CA, USA) を用いる定量的 PCR 法²²⁾に従って行った。TN, FN, および内部標準として用いた glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (G3PDH) 検出用のプライマーの塩基配列および増幅される cDNA のサイズを表 1 に示す。なお, TN および FN のプライマーは, EMBL データベースに登録されている cDNA の塩基配列 (TN: Accession No. U15550, FN: Accession No. X15906) を参考にして, マッキントッシュコンピューター用アプリケーション Oligo version 4.05 (National Bioscience, Plymouth, MN, USA) を用いて設計した。ただし, TN, FN とともに可変的スプライシング領域を含む²⁴⁻²⁶⁾ため, プライマーの設計にあたっては全てのスプライシングアイソフォームを単一の cDNA 断片として検出できるようにした。すなわち, sense oligonucleotide, antisense oligonucleotide とともにその設計部位を可変的スプライシング領域より 3' 末端側に設定した。一方, G3PDH のプライマーは Rat G3PDH Control Amplimer Set (Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA, USA) を用いた。増幅反応は, サー

マルサイクラー Program Temp Control System PC801 (ASTECH, 福岡) を用いて TN は 28 サイクル, FN は 30 サイクルまで行った。なお, 1 サイクルは 95°C で 1 分間の熱変性, 1 分間のアニーリング, さらに 72°C で 1 分間の伸展反応とした。ただし, 1 サイクル目の熱変性は DNA ポリメラーゼの活性を高めるために 10 分間とした。アニーリング温度は, TN cDNA の増幅では 55°C, FN では 56°C, G3PDH では 55°C に設定した。

3) 増幅 cDNA の分離と可視化: 増幅した cDNA は 2% アガロースゲルを用いて電気泳動 (100 V, 30 分間) を行い分離した。さらに, Sambrook らの方法²⁷⁾を参考に, ゲルを 1 µg/ml のエチジウムブロマイドを含む Tris-acetate 緩衝液 (TAE 緩衝液: 0.04 M Tris-acetate, 0.001 M EDTA) に 30 分間浸漬した後, 波長 254 nm の紫外線照射下で Polaroid 667 フィルム (日本ポラロイド, 東京) を用いて泳動バンドを撮影し, cDNA を可視化した。

4) 増幅 cDNA 量の評価: 増幅 cDNA 量の評価は, NIH Image による方法²⁸⁾に従った。すなわち, コンピューターに写真上のバンドを画像として取り込み, TN および FN の泳動バンド濃度を G3PDH に対する相対比として表し定量化した。

6. ウェスタンブロッティング分析

成長因子で処理した細胞の TN 蛋白を検出するためにウェスタンブロッティング分析を行った。以下にその手順を示す。

1) 細胞からの蛋白試料の抽出: 成長因子で処理した細胞を可溶化し回収した後, その可溶画分を蛋白試料とした。すなわち, 9cm ディッシュで培養した細胞を 10 ml の PBS(-) で洗浄後, 蛋白分解酵素阻害剤 [1 tablet /10 ml Complete Mini (Roche Molecular Biochemicals),

1 $\mu\text{g/ml}$ α_2 -Macroglobulin (Sigma)] を含む緩衝液 [20 mM Tris-HCl (pH 7.6), 150 mM NaCl, 1% NP-40] 1.5 ml で可溶化し, 超音波発生装置 (UR-20P, トミー精工, 東京) を用いて, 氷冷しながら細胞を破碎 (28,000 Hz, 60 秒間) した後, $12,000\times g$ で 5 分間遠心して得られた可溶画分を蛋白試料とした。なお, 抽出した蛋白試料の定量は, プロテインアッセイキット (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA) の使用説明書に従い, BSA を標準試料としてマイクロアッセイを行った。

2) ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE): 試料中の蛋白を分画するための SDS-PAGE は Laemmli の方法²⁹⁾ に従った。分画に際しては, 1 試料あたり 10 μg の蛋白量を 6%ポリアクリルアミドゲル中で泳動した (30 mA, 2 時間)。

3) イムノブロッティング: ポリアクリルアミドゲル中の分画蛋白は Towbin らの方法³⁰⁾ に従い, PVDF 膜 (Millipore, Bedford, MA, USA) へ転写した。転写後の PVDF 膜は 5% スキムミルク (雪印乳業, 札幌) を含むトリス緩衝食塩水 (T-TBS: 10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.05% Tween-20, pH7.5) に浸して 1 時間のブロッキング操作を行った。その後, 転写した蛋白に対して抗 TN マウスモノクローナル抗体 (1:1000 希釈) を含む T-TBS 中で, 2 時間室温で反応させた。さらに T-TBS で洗浄後, 二次抗体を一次抗体と同様の希釈率で反応させて TN 蛋白の検出を行った。なお, 検出には ECL 蛍光検出キット (Amersham Pharmacia Biotech) を用いた。

7. 細胞接着能分析

細胞接着能分析に用いる FN コーティングプレートは, 精製 FN を細胞培養用プレート

にコーティングすることによって作製した。すなわち、精製 FN を PBS(-) で希釈して 50 µg/ml の溶液とし、これを 12 well プレート (MS-80120; 住友ベークライト) に 1 well あたり 400 µl 添加し、室温で 45 分間静置した後、溶液を除去した。なお、対照群では BSA を用いて同様の処理を行った。

細胞接着能分析は、細胞を FN コーティングプレートに播種し、接着細胞数を測定することによって評価した。まず、成長因子で処理した細胞を PBS(-) で洗浄し、0.05% Trypsin/0.53 mM EDTA 4Na 溶液で 37°C、5 分間の処理を行い、細胞を培養ディッシュから剥離・分散させた。引き続き、1% BSA 含有 DMEM/F-12 で 2.0×10^5 個/ml の細胞懸濁液を調製した。さらに、この細胞懸濁液を 10 倍希釈し、 2.0×10^4 個/well となるように FN コーティングプレートへ添加し、37°C、2 時間のインキュベーションを行った後、浮遊細胞を除去してプレートの底面に接着している細胞を位相差顕微鏡下で観察し細胞数をカウントした。一方、TN 蛋白の機能を阻害する実験では、基質コーティングプレートへの播種に先立って、細胞懸濁液へ抗 TN 抗体を 10 µg/ml 添加して 4°C、1 時間のインキュベーションを行い、同様に接着細胞数をカウントした。

8. 統計分析

全ての実験は少なくとも 3 回以上行い、実験結果を平均値 ± 標準誤差で表した。有意差検定には Student-t 検定を用いて統計学的に分析した。

結果

1. 細胞増殖分析

RPC-C2A 細胞のミトコンドリア呼吸鎖活性, DNA 合成能, および細胞数の測定結果を図 1 に示す。ミトコンドリア呼吸鎖活性 (図 1-A) は, 培養開始後 48~72 時間に顕著に上昇し (図中太線), 再び 96~120 時間にも上昇を示した。DNA 合成 (図 1-B) は, 培養開始後 48~72 時間で顕著に上昇し (図中太線), 72 時間以降では低下した。細胞数 (図 1-C) は, 培養開始後 48 時間から急激に増加し (図中太線), 72 時間でほぼコンフルエントに達し (図中矢印), 以後一定数に維持された。これらの結果から 48~72 時間培養した細胞を以下の実験に供した。

2. TN mRNA の発現

RPC-C2A 細胞を 48 時間培養した後, 成長因子で 24 時間処理した場合の TN の mRNA 発現を図 2 に示す。TN の RT-PCR 産物は, 403 bp の位置に単一のバンドとして検出され, 内部標準である G3PDH は 983 bp の位置に認められた (図 2-A)。RPC-C2A 細胞は, 成長因子で処理しなかった場合も TN mRNA を発現しており, その発現は TGF- β , HGF, RA で処理した場合に顕著に増強されていた (図 2-A)。これら成長因子の TN mRNA 発現量に及ぼす効果を比較するため, TN のバンドを G3PDH に対する相対比で表示すると, 10% FBS EMEM では 5 倍, TGF- β , HGF, RA で処理した場合は 7~8 倍と TN mRNA の発現が亢進しており, 一方, bFGF, EGF で処理した場合に顕著な変化は認められなかった (図 2-B)。

3. TN 蛋白の発現

mRNA 発現の場合と同じ条件下で実験を行った場合の RPC-C2A 細胞が合成した TN 蛋白のウェスタンブロット像を図 3 に示す。分子量約 250 kDa に位置するバンドとして検出される TN 蛋白は、TGF- β , HGF, RA および 10% FBS の処理によって、コントロールに比べて増加した。一方、bFGF, EGF ではコントロールとの差は認められなかった。

4. FN mRNA の発現

TN の場合と同様の実験条件下で、FN の mRNA 発現を調べた結果を図 4 に示す。RPC-C2A 細胞における FN の mRNA は、344 bp の位置に単一のバンドとして検出された。RPC-C2A 細胞は、コントロールでも FN mRNA を発現しており、試した全ての成長因子で影響はみられず、コントロールと同程度の発現量を示した。

5. 細胞接着能分析

FN コーティングプレートへの RPC-C2A 細胞の接着能の分析結果を図 5 に示す。図 5-A は接着した細胞の位相差顕微鏡写真である。細胞接着能は、bFGF, EGF で処理した場合はコントロールとほぼ同程度であったが、TGF- β , HGF, RA の処理ではコントロールに比べて細胞接着が低下していた。次に、位相差顕微鏡の一定視野内 (1.17 mm²) における接着細胞数をカウントした結果を図 5-B に示す。FN でコーティングしたディッシュに対する接着細胞数は、bFGF, EGF で処理した場合はコントロールと有意な差はなかったが、TGF- β , HGF,

RA で処理した場合は、コントロールに比べ有意に減少した。なお、対照として BSA でコーティングした場合の接着細胞数は全ての条件下においてわずかであった。

次に、抗 TN 抗体で処理した RPC-C2A 細胞の FN コーティング層に対する細胞接着能の分析結果を図 6 に示す。抗 TN 抗体で処理しなかった群では、接着細胞数は図 5-A で示したと同様に、TGF- β , HGF, RA で処理した細胞でコントロールより減少していた。一方、抗 TN 抗体処理で細胞膜上の TN の機能を阻害した場合、上記 3 種の成長因子の接着抑制効果は消失し、接着細胞数はコントロールとほぼ同程度であった（図 6-A）。これらの細胞数をカウントした結果を図 6-B に示す。抗 TN 抗体で処理しなかった場合、コントロールと比較して TGF- β では 48%, HGF では 59%, RA では 50% まで細胞接着が抑制されていたが、抗 TN 抗体を処理した場合では、TGF- β 群, HGF 群, RA 群, いずれにおいても抗体添加によって接着細胞数が有意に増加し、どの成長因子で刺激した細胞でも接着細胞数はコントロールと同程度になった。

考察

本研究では、ラット歯髄由来細胞株 RPC-C2A の細胞接着能とそれに関する TN および FN の発現に及ぼす成長因子 TGF- β , bFGF, EGF, HGF, RA の影響について検討した。得られた知見は次の通りである。1) 歯髄細胞の細胞増殖期における TN mRNA および TN 蛋白の発現は TGF- β , HGF, RA 刺激によって著明に増加した, 2) 歯髄細胞の FN mRNA の発現は用いた成長因子によって影響を受けなかった, 3) 歯髄細胞の FN コーティング層に対する接着能は, TGF- β , HGF, RA によって抑制された。4) これらの抑制は, 細胞を TN の抗体で処理することによって一様に回復した。以上の 4 点から, 歯髄細胞が FN を介してディッシュに接着する際には, TN が拮抗因子として作用し, TGF- β , HGF, RA が TN 蛋白の発現を促進することによって接着作用を抑制していることが示唆された。

TN は, 1980 年代に複数の研究者によって同定された接着性 ECM であり, 発見当初は myotendinous, glioma mesenchymal extracellular matrix protein (GMEM), cytactin, J1, hexabrachion,あるいは neuronectin と呼ばれていた。しかし, 後に Chiquet-Ehrismann ら⁷⁾ は抗 myotendinous 抗体が乳腺の発生初期と癌の緻密間質に特異的に発現していることを見い出すとともに, これらの分子が同一のものであることを明らかにし, tenascin (TN) と呼称を統一した。この蛋白の分子構造は分子量 190~250 kDa のポリペプチド鎖サブユニット三分子が, アミノ基末端付近でコイル状に会合し大分子を形成して, さらにその二分子がジスルフィド結合した六量体構造の糖蛋白である³¹⁾。それぞれのサブユニットは, アミノ末端からカルボキシル末端に向かって, EGF 様, FN III 型様, fibrinogen 様ドメイ

ンが連なったキメラ構造をとる。TN は生体内では、器官発生、癌の形成、創傷治癒といった組織の構築や再構築の盛んな時期に一過性に発現する。すなわち、生体内での発現時期と発現部位が他の ECM に比べて限局しており、このことは多くの ECM の中でも、TN を特徴づける性質の一つである。したがって TN は一定の時期に一定の場所で何らかの機能を発揮するものと考えられる。例えば、TN は TGF- β による新生骨の形成を促進し³²⁾、また、卵巣癌細胞の走化性を亢進し、癌の浸潤・転移を促進する³³⁾。さらに、胎生腸管組織において増殖・分化の盛んな上皮によって産生された局所因子が間葉組織の TN 合成を促進し³⁴⁾、脳の外傷部では TN が創傷部位を取り囲むように発現する³⁵⁾。一方、歯胚での TN 発現に関しては発生段階を追って詳細に検討されており、Thesleff ら⁵⁾は、その発現は歯胚の間葉組織に限局し、蕾状期と鐘状期で著しいと報告している。歯髓組織は歯胚の間葉組織を起源としているが、本研究では、培養歯髓細胞を用いて、TN 発現とその機能について成長因子の作用を関連づけながら検討した。まず最初に、RPC-C2A 細胞の細胞増殖動態を調べ、ミトコンドリア呼吸鎖活性、DNA 合成、細胞数の全てが上昇し増加している時期を見い出し、その結果から培養開始 48 時間以降のサブコンフルエントの細胞を実験に用いた (図 1)。この時期は細胞が増殖から分化へと転換するステージでもあり、TN の発現および成長因子に対する応答性をみるのに適切な時期であると思われた。事実、TN が発現し成長因子に対する応答性も高かった。データには示さなかったが、培養 132 時間後において同様の実験を行った場合、TN 発現に及ぼす成長因子の影響はわずかであった。

器官発生に注目すると、生体組織は成長因子の作用を介して組織の構成要素である ECM

と細胞の相互作用によって構築される³⁶⁾。上皮間葉相互作用も例外でなく、成長因子が間葉系細胞に作用し、上皮と間葉の界面すなわち基底膜周囲で ECM の生理作用を調節することによって組織が構築されていくものと考えられる。歯胚の蕾状期、鐘状期では基底膜に沿って TN が強く発現することが報告され^{5, 37)}、さらに、歯胚の上皮組織と間葉組織を切断して再び接触させると、接触界面の間葉組織側に限局的に TN 発現が観察されることも明らかとなっている³⁸⁾。また、歯胚では成長因子の分泌が発生に伴い変化するという報告が多い^{13,14,16,17,20,39)}。本研究における RPC-C2A 細胞の TN 発現は、mRNA および蛋白レベルいずれにおいても TGF- β 、HGF、RA の刺激によって増加した (図 2, 図 3)。この結果は、TGF- β 、HGF、RA が TN 発現の促進因子であることを示唆するものである。これらの成長因子と歯胚との関連については以下のような報告がある。TGF- β は歯胚の蕾状期から鐘状期にかけて発現しており、その部位は鐘状期では基底膜付近に強くみられ¹¹⁾、HGF については、歯胚の帽状期から鐘状期にかけて歯乳頭に発現が局在している^{16,17)}。RA に関しても、RA-binding protein I が鐘状期の歯乳頭に発現が局在している²⁰⁾。さらに、これらの成長因子の発現様態は歯胚における TN の発現^{5, 37)}と相似していることから、歯胚の成長段階において TGF- β 、HGF、RA はオートクライン的に間葉系細胞に作用し TN 発現を促進している可能性が考えられる。また、歯髓細胞と成長因子の関連性についての報告も多い。TGF- β は、歯髓細胞の硫酸グリコサミノグリカン合成を促進し⁴⁰⁾、アルカリフォスファターゼ活性を上昇させる作用がある^{41,42)}。HGF は急性歯髓炎組織中に発現し、炎症性サイトカインで刺激すると培養歯髓細胞の HGF 発現が誘導される⁴³⁾。RA は、培養歯髓細胞におけるオステオポンチンの mRNA 発現を誘導する⁴⁴⁾。bFGF は歯髓細胞の DNA

合成を促進し、アルカリフォスファターゼ活性やオステオネクチンの合成を抑制する⁴⁵⁾。EGF は bFGF と同様に歯髄細胞の増殖を促すが、アルカリフォスファターゼ活性を抑制する⁴¹⁾。これらの報告からも明らかなように、本研究で用いた成長因子はいずれも歯胚成長だけでなく歯髄細胞の分化とも密接な関係があり、とりわけ、TGF- β 、HGF、RA は歯胚間葉組織や歯髄組織における TN 発現を介した分化誘導の重要な調節因子であると考えられる。一方、RPC-C2A 細胞の FN 発現は今回用いた成長因子の刺激によって変化しなかった (図 4)。歯胚における FN の発現様態については、鐘状期後期に硬組織の形成が始まるまで間葉組織に局限して発現する⁴⁶⁾ことが明らかとなっている。TN も同様の発現をする⁵⁾ものの、TN の発現量の変動に比べると FN の発現は変化がなく一定している⁴⁶⁾。したがって、図 4 で示した結果は、種々の成長因子の影響を受ける生体内にあっても、歯胚間葉組織での FN 発現はあまり変化を受けにくいことを反映しているのかもしれない。

TN は接着性 ECM として同定された分子であるが、後に FN の細胞接着機能に対して阻害的に作用することが見いだされた^{9, 10)}。Aufderheide ら³⁴⁾は TN の接着阻害機能が細胞と ECM の相互作用を調節し、発生段階での器官の組織構築を変化させている可能性があるとして報告している。今回、成長因子で刺激した RPC-C2A 細胞の FN に対する接着能を検討した結果、TGF- β 、HGF、RA で刺激した場合に FN に対する細胞接着が有意に抑制された (図 5)。この結果を TN の発現様態 (図 2-B) と比較すると、TN 発現が促進された場合に細胞接着が抑制されるという興味ある現象が観察された。さらに、BSA に対しては、コントロールを含め、どの成長因子を加えた場合も細胞接着はほとんど起こらなかった (図 5-B)。これらの結果から、歯髄細胞の FN を介する接着が TN によって阻害されることが

強く示唆された。また、抗 TN 抗体で前処理した場合、TN によって細胞接着が抑制されたと考えられる群 (TGF- β , HGF, RA 添加細胞) では、いずれも接着細胞数が一様に増加した (図 6)。このことから、歯髄細胞の FN に対する接着抑制は、成長因子刺激によって増加した TN に起因していることが裏付けられた。

歯胚における TN の発現様態^{5,37)}、TN の機能に関する過去の報告^{7,34,47,48)}、ならびに本研究で得られた結果から、器官発生とくに歯胚の形成における上皮間葉相互作用の分子機構を推察すると次のようになる。上皮間葉相互作用において、TN は上皮と間葉の界面付近で成長因子の作用による発現制御をうけ、その結果、細胞と ECM から成る組織の結合を弛緩させ³⁴⁾、細胞の増殖⁷⁾、走化⁴⁷⁾を促し、間葉組織に隣接する上皮組織の分岐や伸長を制御した結果⁴⁸⁾、器官の形態形成に関与するものと考えられる。実際、TN の生体における生理作用に関しては、TN ノックアウトマウスの創傷治癒過程での FN 発現が抑制される^{49,50)}、あるいは炎症の組織修復に異常を示す^{51,52)}という報告がある。しかしながら、TN ノックアウトマウスは外見的に正常^{53,54)}であるため、TN の器官発生過程における機能に関しては未だ不明な点が多い。加えて、器官発生における上皮間葉相互作用では TN の機能を代替する分子が存在する可能性もある。このような点を解決するためには、TN ノックアウトマウス由来の歯胚を用いた器官培養実験等の研究を通じて、TN の器官発生における上皮間葉相互作用の分子機構を明らかにすることが重要である。いずれにせよ、今回の研究で得られた TN の発現と調節に関する成果は、歯胚の成長、あるいは未分化間葉細胞に富む歯髄組織における分化誘導機構を解明するための有用な情報となりうるものと考えられる。

結論

歯髓細胞のテネイシン発現は成長因子により制御されており，テネイシンはフィブロネクチンと拮抗して細胞接着を阻害し，成長因子によるテネイシン発現の増減を介して細胞接着が調節されることが明らかとなった。

謝辞

稿を終えるにあたり，終始御指導，御校閲を賜った歯科保存学第二講座永田俊彦教授に深甚なる謝意を表しますとともに，御校閲，御助言を戴きました口腔生化学講座井上秀夫教授，歯科保存学第一講座松尾敬志教授に深謝致します。また，直接御指導と御助言を戴いた歯科保存学第二講座木戸淳一助教授，澤孝賢博士に厚く御礼申し上げます。最後に，数々の御教示と御援助を戴いた歯科保存学第二講座の諸先生方に深謝致します。

文献

- 1) Thesleff I, Vaahtokari A and Partnen AM : Regulation of organogenesis. Common molecular mechanism regulating the development of teeth and other organs. *Int J Dev Biol* 39, 35-50 (1995)
- 2) Kollar EJ and Baird GR : The influence of the dental papilla on the development of tooth shape in embryonic mouse tooth germs. *J Embryol Exp Morphol* 21, 131-148 (1969)
- 3) Kollar EJ and Baird GR : Tissue interactions in embryonic mouse tooth germs. II. The inductive role of the dental papilla. *J Embryol Exp Morphol* 24, 173-186 (1970)
- 4) Gurdon JB : The generation of diversity and pattern in animal development. *Cell* 68, 185-199 (1992)
- 5) Thesleff I, Mackie E, Vainio S and Chiquet-Ehrismann R : Changes in the distribution of tenascin during tooth development. *Development* 101, 289-296 (1987)
- 6) Thesleff I, Vainio S and Jalkanen M : Cell-matrix interactions in tooth development. *Int J Dev Biol* 33, 91-97 (1989)
- 7) Chiquet-Ehrismann R, Mackie EJ, Pearson CA and Sakakura T : Tenascin: an extracellular matrix protein involved in tissue interactions during fetal development and oncogenesis. *Cell* 47, 131-139 (1986)
- 8) Thesleff I, Partanen AM and Vainio S : Epithelial-mesenchymal interactions in tooth morphogenesis: the roles of extracellular matrix, growth factor, and cell surface receptors. *J*

Craniofac Genet Dev Biol 11, 229-237 (1991)

- 9) Chiquet-Ehrismann R, Kalla P, Pearson CA, Beck K and Chiquet M : Tenascin interferes with fibronectin action. Cell 53, 383-390 (1988)
- 10) Chiquet-Ehrismann R : What distinguishes tenascin from fibronectin? FASEB J 4, 2598-2604 (1990)
- 11) D'Souza RN, Flanders K, Butler WT : Colocalization of TGF- β 1 and extracellular matrix proteins during rat tooth development . Proc Finn Dent Soc 88, 419-426 (1992)
- 12) Vaahtokari A, Vainio S and Thesleff I : Associations between transforming growth factor β 1 RNA expression and epithelial-mesenchymal interactions during tooth morphogenesis. Development 113, 985-994 (1991)
- 13) Kettunen P, Karavano I and Thesleff I : Responsiveness of developing dental tissues to fibroblast growth factors: expression of splicing alternatives of FGFR1, -2, -3, and of FGFR4; and stimulation of cell proliferation by FGF-2, -4, -8, and -9. Dev Genet 22, 374-385 (1998)
- 14) Snead ML, Luo W, Oliver P, Nakamura M, Don-Wheeler G, Bessem C, Bell GI, Rall LB and Slavkin HC : Localization of epidermal growth factor precursor in tooth and lung during embryonic mouse development. Dev Biol 134, 420-429 (1989)
- 15) Partanen AM, Eklom P and Thesleff I : Epidermal growth factor inhibits morphogenesis and cell differentiation in cultured mouse embryonic teeth. Dev Biol 111, 84-94 (1985)
- 16) Sonnenberg E, Meyer D, Weider KM and Birchmeier C : Scatter factor/hepatocyte growth factor and its receptor, the c-met tyrosine kinase, can mediate a signal exchange between

- mesenchyme and epithelia during mouse development. *J Cell Biol* 123, 223-235 (1993)
- 17) Tabata MJ, Kim K, Liu JG, Yamashita K, Matsumura T, Kato J, Iwamoto M, Wakisaka S, Matsumoto K, Nakamura T, Kumegawa M and Kurisu K : Hepatocyte growth factor is involved in the morphogenesis of tooth germ in murine molars. *Development* 122, 1243-1251 (1996)
 - 18) Knudsen PA : Fusion of upper incisors at bud or cap stage in mouse embryos with exencephaly induced by hypervitaminosis A. *Acta Odont Scand* 23, 549-565 (1965)
 - 19) Knudsen PA : Congenital malformations of lower incisors and in exencephalic mouse embryos, induced by hypervitaminosis A. *Acta Odont Scand* 25, 669-691 (1967)
 - 20) Berkovitz BK, Maden M and Eriksson U : The distribution of cellular retinoic acid-binding protein I during odontogenesis in the rat incisor. *Arch Oral Biol* 38, 837-843 (1993)
 - 21) Kasugai S, Adachi M and Ogura H : Establishment and characterization of a clonal cell line (RPC-C2A) from dental pulp of the rat incisor. *Arch Oral Biol* 33, 887-891 (1988)
 - 22) Nakayama H, Yokoi H and Fujita J : Quantification of mRNA by non-radioactive RT-PCR and CCD imaging system. *Nucl Acids Res* 20, 4939 (1992)
 - 23) Chomczynski P and Sacchi N : Single-step method of RNA isolation by guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162, 156-159 (1987)
 - 24) LaFleur DW, Fagin JA, Forrester JS, Rubin SA and Sharifi BG : Cloning and characterization of alternatively spliced isoforms of rat tenascin. *J Biol Chem* 269, 20757-20763 (1994)

- 25) Zhao Y and Young SL : TGF- β regulates expression of tenascin alternative-splicing isoforms in fetal rat lung. *Am J Physiol* 268, L173-180 (1995)
- 26) Schwarzbauer JE, Patel RS, Fonda PD and Hynes RO : Multiple sites of alternative splicing of the rat fibronectin gene transcript. *EMBO J* 6 , 2573-2580 (1987)
- 27) Sambrook J : "Agarose Gel Electrophoresis". Molecular cloning. Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T. A laboratory manual 2nd ed. New York. Cold Spring Harbor Laboratory, 1989, 6.3-34
- 28) Becher A, Reith A, Napiwotzki J and Kadenbach B : A quantitative method determining initial amounts of DNA by polymerase chain reaction cycle titration using digital imaging and a novel DNA stain. *Anal Biochem* 237, 204-207 (1996)
- 29) Laemmli UK : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685 (1970)
- 30) Towbin H, Staehelin T and Gordon J : Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76, 4350-4354 (1979)
- 31) Redick SD and Schwarzbauer JE : Rapid intracellular assembly of tenascin hexabrachions suggests a novel cotranslational process. *J Cell Sci* 108, 1761-1769 (1995)
- 32) Mackie EJ, Abraham LA, Taylor SL, Tucker RP and Murphy LI : Regulation of tnascin-C expression in bone cells by transforming growth factor- β . *Bone* 22, 301-307 (1998)
- 33) Wilson KE, Bartlett JMS, Miller EP, Smyth JF, Mullen P, Miller WR and Langdon SP:

Regulation and function of the extracellular matrix protein tenascin-c in ovarian cancer cell lines. *Br J Cancer* 80, 685-692 (1999)

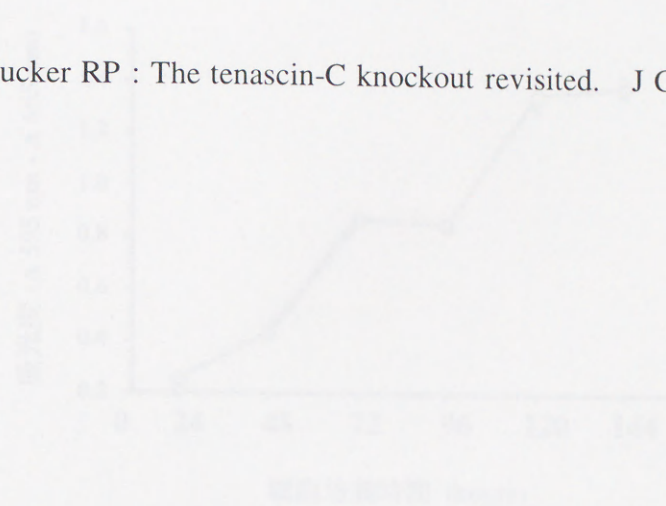
- 34) Aufderheide E and Ekblom P : Tenascin during gut development: appearance in the mesenchyme, shift in molecular forms, and dependence on epithelial-mesenchymal interactions. *J Cell Biol* 107, 2341-2349 (1988)
- 35) Laywell ED, Dorries U, Bartsch U, Faissner A, Schachner M and Steindler DA : Enhanced expression of the developmentally regulated extracellular matrix molecule tenascin following adult brain injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 2634-2638 (1992)
- 36) Taipale J and Keski-Oja J : Growth factors in the extracellular matrix. *FASEB J* 11, 51-59 (1997)
- 37) Vainio S and Thesleff I : Sequential induction of syndecan, tenascin and cell proliferation associated with mesenchymal cell condensation during early tooth development. *Differentiation* 50, 97-105 (1992)
- 38) Vainio S, Jalkanen M and Thesleff I: Syndecan and tenascin expression is induced by epithelial-mesenchymal interactions in embryonic tooth mesenchyme. *J Cell Biol* 108, 1945-1954 (1989)
- 39) Obberghen-Schilling EV, Roch NS, Flanders KC, Sporn MB and Roberts AB : Transforming growth factor- β 1 positively regulation its own expression in normal and transformed cells. *J Biol Chem* 263, 7741-7746 (1988)
- 40) Nishikawa H, Ueno A, Nishikawa S, Kido J, Ohishi M, Inoue H and Nagata T : Sulfated

- glycosaminoglycan synthesis and its regulation by transforming growth factor- β in rat clonal dental pulp cells. *J Endodon* 26, 169-171 (2000)
- 41) Liang RF, Nishimura S, Maruyama S, Hanazawa S, Kitano S and Sato S : Effects of transforming growth factor- β and epidermal growth factor on clonal rat pulp cells. *Arch Oral Biol* 35, 7-11 (1990)
 - 42) Shirakawa M, Shiba H, Nakanishi K, Ogawa T, Okamoto H, Nakashima K, Noshiro M and Kato Y : Transforming growth factor-beta-1 reduces alkaline phosphatase mRNA and activity and stimulates cell proliferation in cultures of human pulp cells. *J Dent Res* 73, 1509-1514 (1994)
 - 43) Ohnishi T, Suwa M, Oyama T, Arakaki N, Torii M and Daikuhara Y : Prostaglandin E₂ predominantly induced production of hepatocyte growth factor/scatter factor in human dental pulp in acute inflammation. *J Dent Res* 79, 748-755 (2000)
 - 44) Ohishi M, Horibe M, Ikedo D, Miyazaki M, Ohishi K, Kataoka M, Kido J and Nagata T : Effect of retinoic acid on osteopontin expression in rat clonal dental pulp cells. *J Endodon* 25, 683-685 (1999)
 - 45) Shiba H, Nakamura S, Shirakawa M, Nakanishi K, Okamoto H, Satakeda H, Noshiro M, Katayama M and Kato Y : Effects of basic fibroblast growth factor on proliferation, the expression of osteonectin (SPARC) and alkaline phosphatase, and calcification in cultures of human pulp cells. *Dev Biol* 170, 457-466 (1995)
 - 46) Thesleff I, Stenman S, Vaheri A and Timpl R : Changes in the matrix proteins, fibronectin

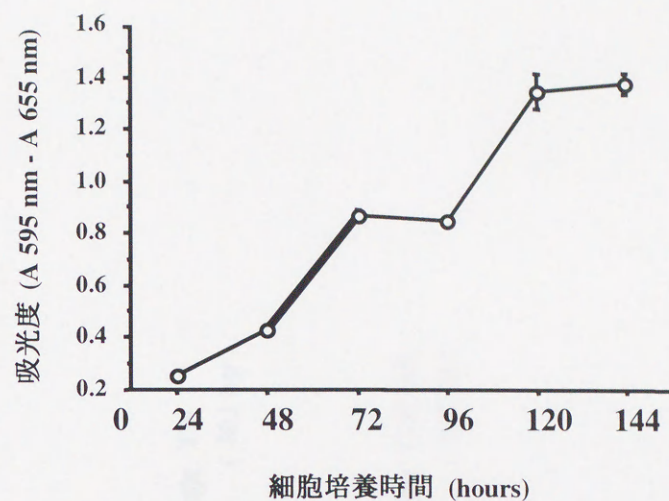
- and collagen, during differentiation of mouse tooth germ. *Dev Biol* 70, 116-126 (1979)
- 47) Mackie EJ, Tucker RP, Halfter W, Chiquet-Ehrismann R and Epperlein HH : The distribution of tenascin coincides with pathways of neural crest cell migration. *Development* 102, 237-250 (1988)
- 48) Tan SS, Crossin KL, Hoffman S and Edelman GM : Asymmetric expression in somites of cytotactin and its proteoglycan ligand is correlated with neural crest cell distribution. *Proc Natl Acad Sci USA* 84, 7977-7981 (1987)
- 49) Matsuda A, Yoshiki A, Tagawa Y, Matsuda H and Kusakabe M : Corneal wound healing in tenascin knockout mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40, 1071-1080 (1999)
- 50) Forsberg E, Hirsch E, Frohlich L, Meyer M, Ekblom P, Aszodi A, Werner S and Fassler R : Skin wounds and severed nerves heal normally in mice lacking tenascin-C. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 6594-6599 (1996)
- 51) Koyama Y, Kusubata M, Yoshiki A, Hiraiwa N, Ohashi T, Irie S and Kusakabe M : Effect of tenascin-C deficiency on chemically induced dermatitis in the mouse. *J Invest Dermatol* 111, 930-935 (1998)
- 52) Nakao N, Hiraiwa N, Yoshiki A, Ike F and Kusakabe M : Tenascin-C promotes healing of Habu-snake venom-induced glomerulonephritis: studies in knockout congenic mice and in culture. *Am J Pathol* 152, 1237-1245 (1998)
- 53) Saga Y, Yagi T, Ikawa Y, Sakakura T and Aizawa S : Mice develop normally without tenascin. *Gene Dev* 6, 1821-1831 (1992)

54) Mackie EJ and Tucker RP : The tenascin-C knockout revisited. J Cell Sci 112, 3847-3853

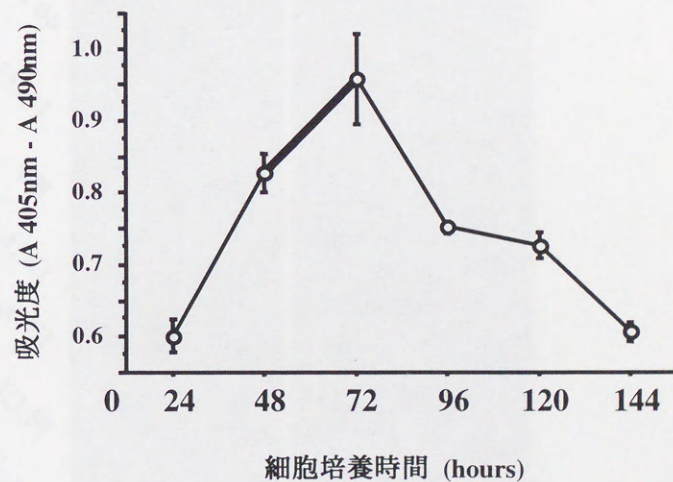
(1999)



A



B



C

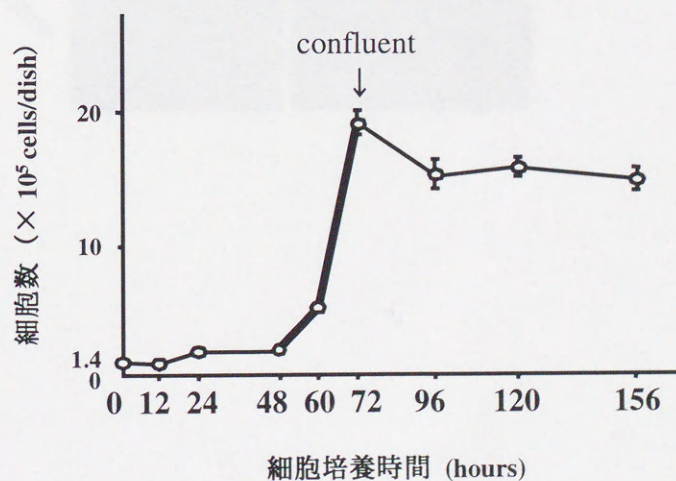
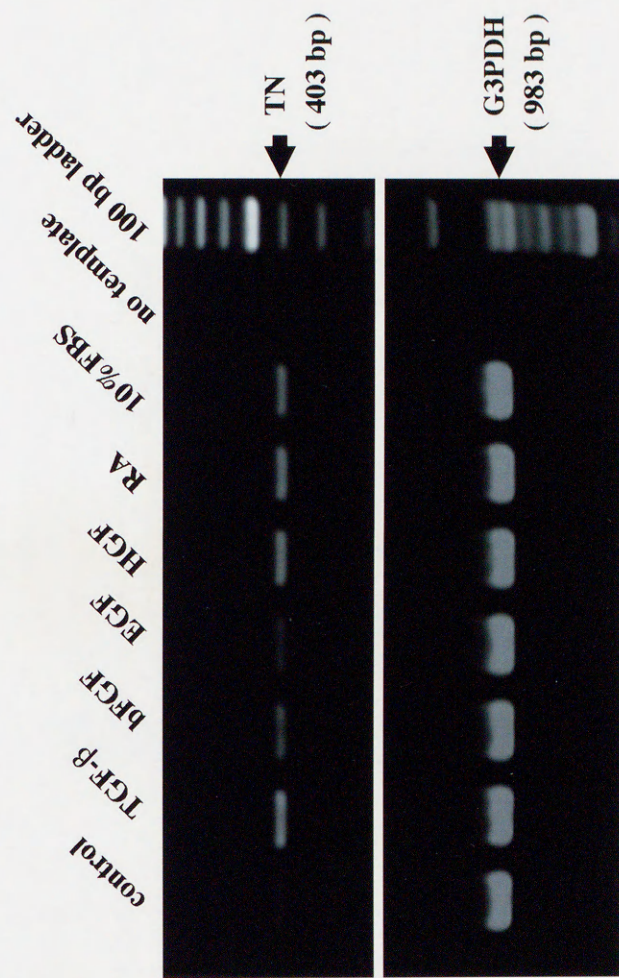


図 1



2-A

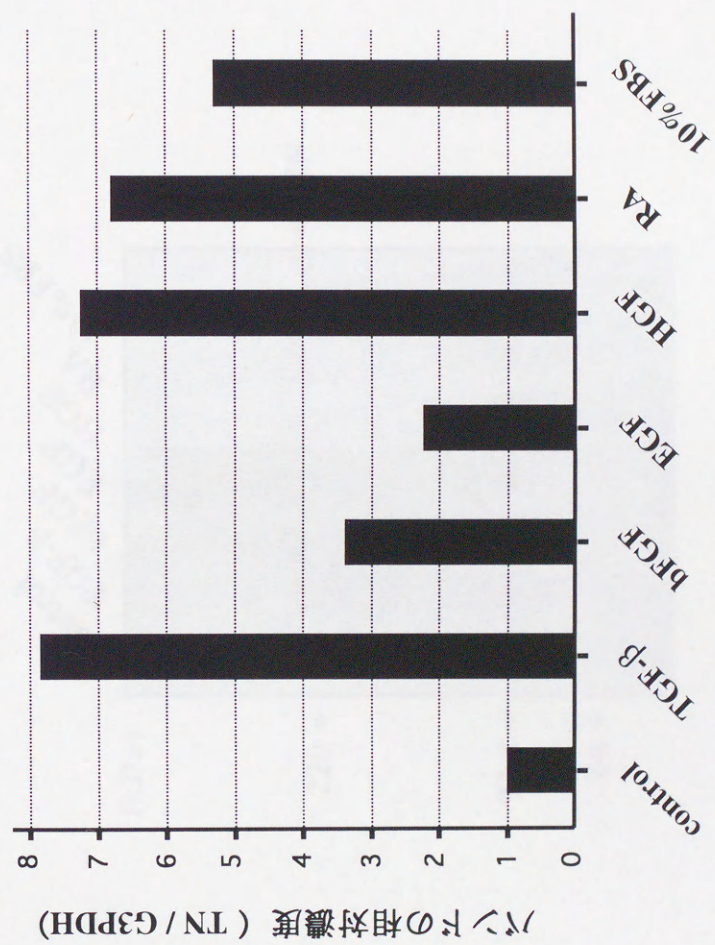
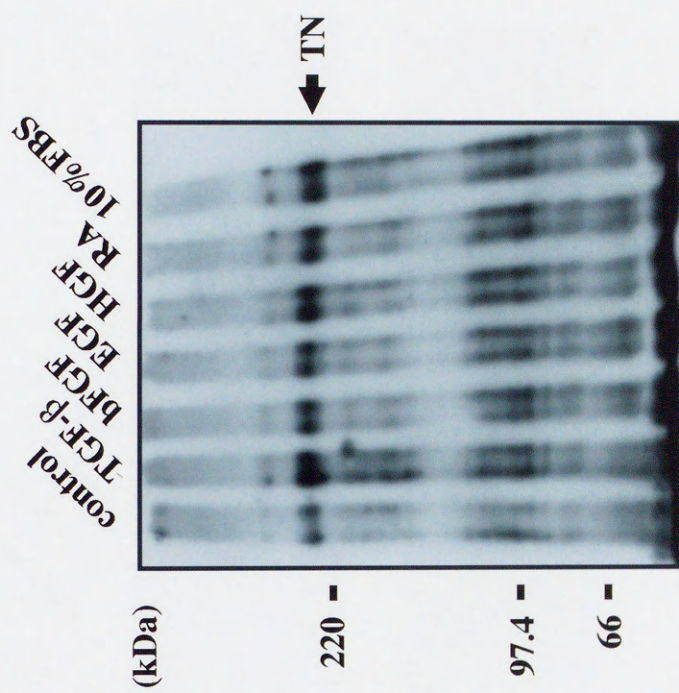
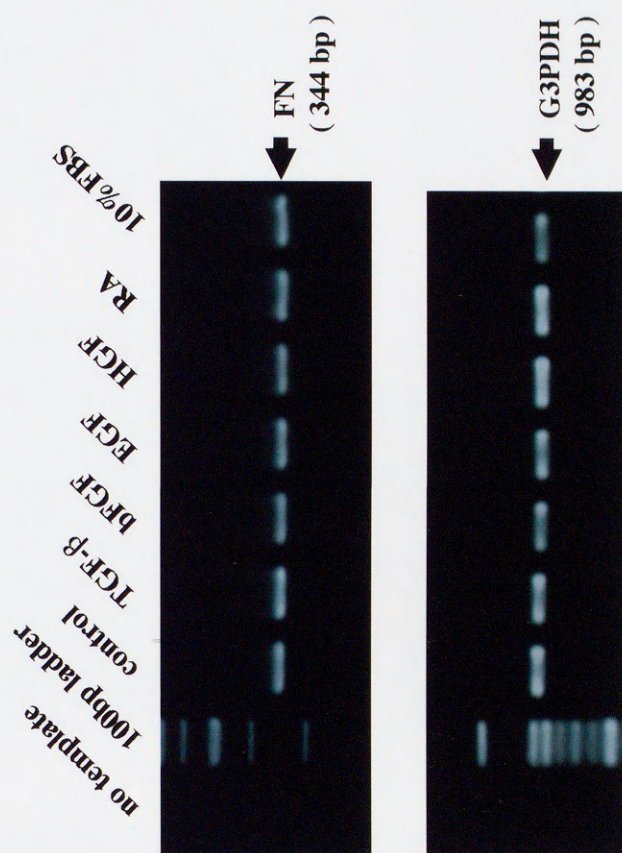
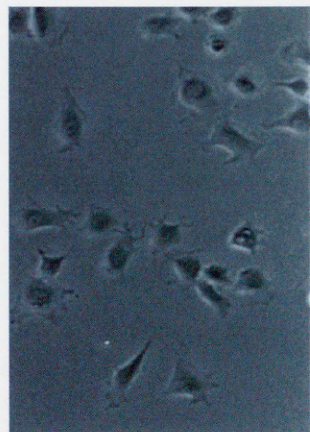


図 2-B



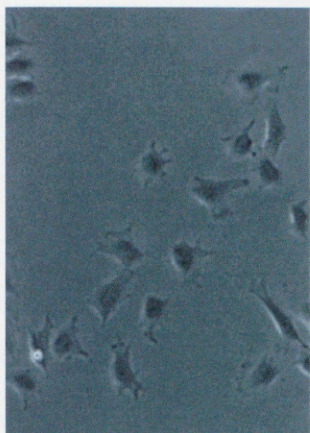




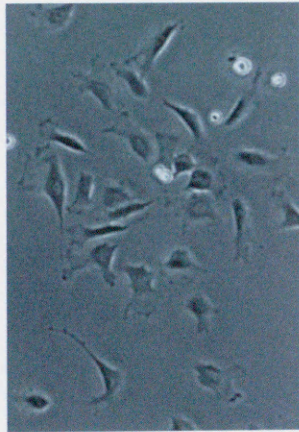
control



TGF- β



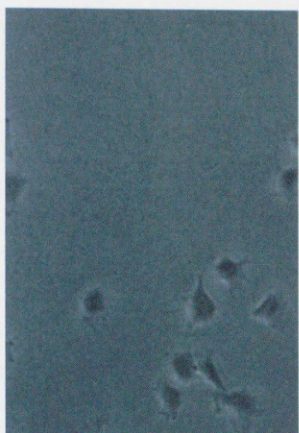
bFGF



EGF



HGF



RA



5-A

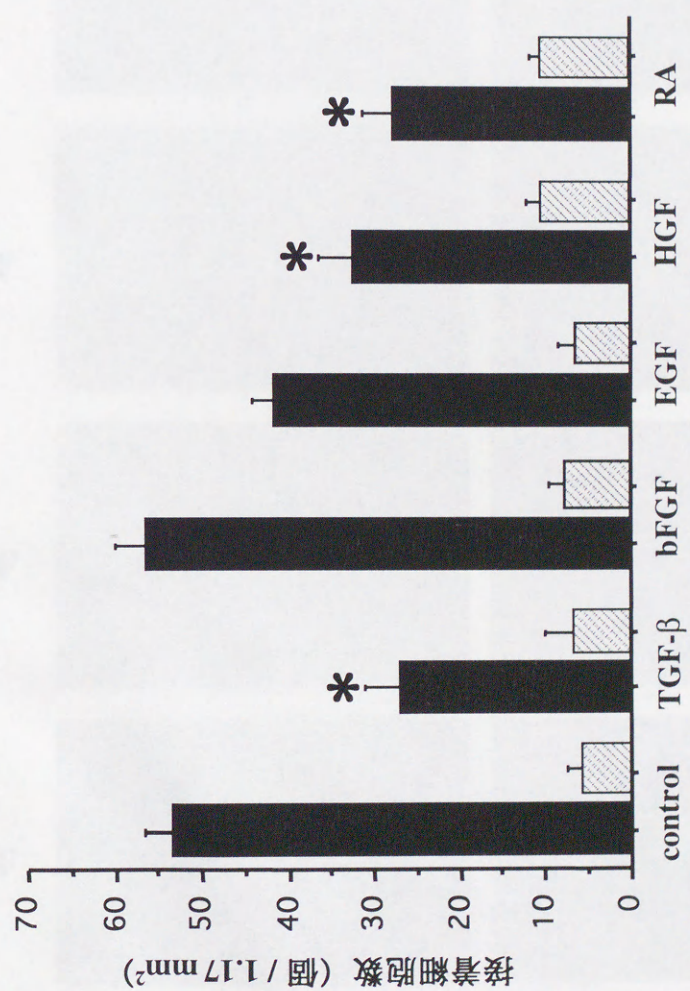


図 5-B

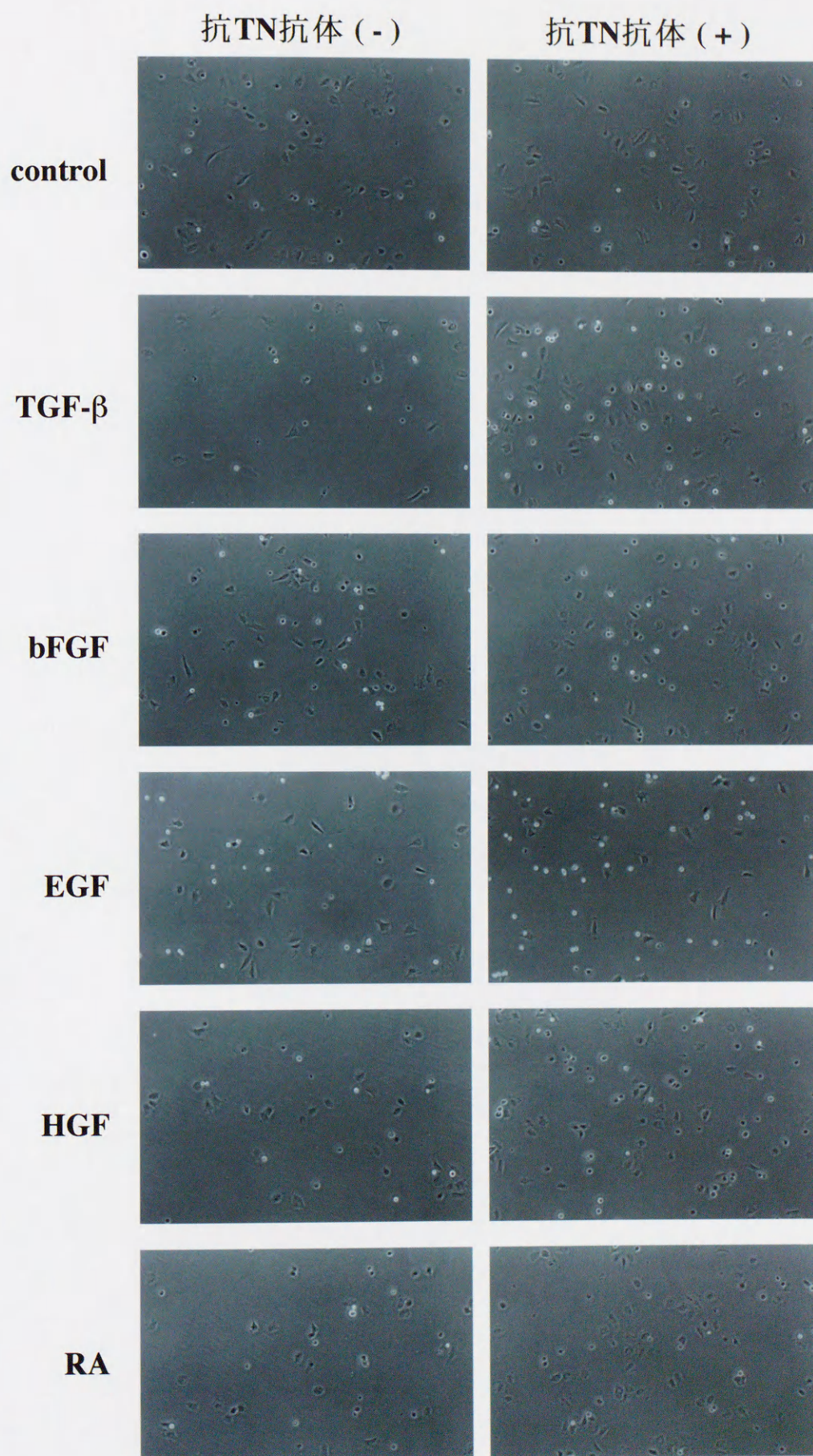


図 6-A

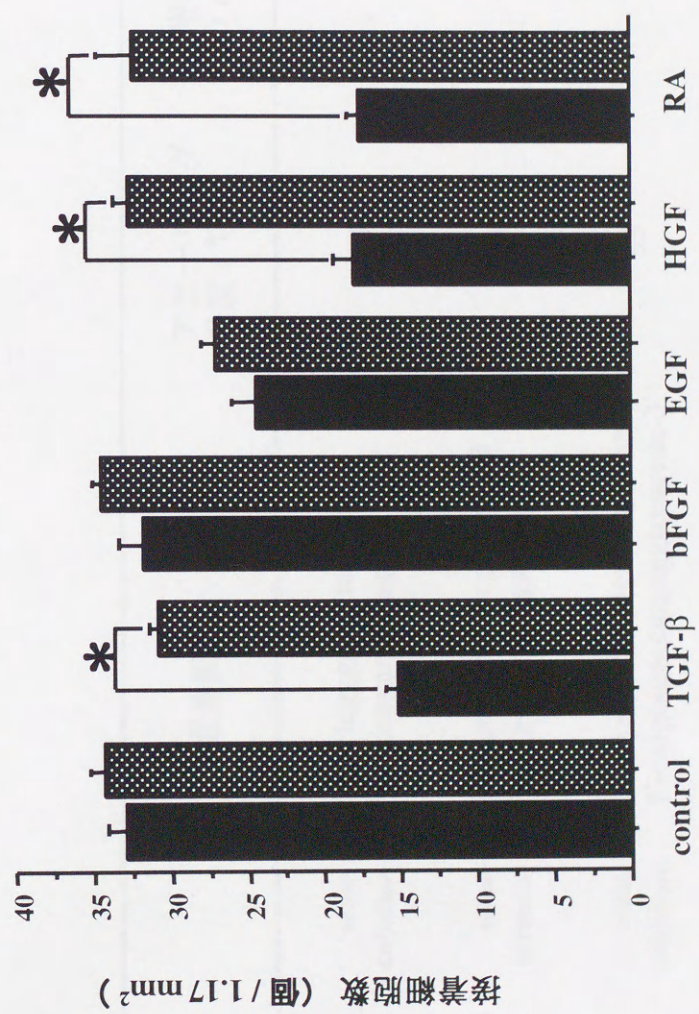


図 6-B

表1 プライマーの塩基配列およびPCR条件

増幅遺伝子	塩基配列	アニーリング 温度 (°C)	増幅回数 (cycles)	cDNAサイズ (bp)
TN	sense 5'-gtctcggggtctctacac-3'	55	28	403
	antisense 5'-ccacagactcatagaccagg-3'			
FN	sense 5'-aggcacaagatccgagaaga-3'	56	30	344
	antisense 5'-gttgcttcattggggatcgca-3'			
G3PDH	sense 5'-tgaaggtcgggtgtcacaggatttggc-3'	55	30	983
	antisense 5'-catgtaggccatgaggccaccac-3'			

図の説明

図1 RPC-C2A 細胞の増殖分析

RPC-C2A 細胞を 10%FBS 含有 EMEM 培地で最長 156 時間培養し、増殖の指標となる細胞のミトコンドリア呼吸鎖活性(A), BrdU (B), 細胞数(C)についてそれぞれ経時的に測定した。データは 3 回行った実験の平均値±標準誤差である。

(A) RPC-C2A 細胞のミトコンドリア呼吸鎖活性の変動を、テトラゾリウム塩 (MTT) の還元産物であるフォルマザンの吸光度で示す。吸光度は、フォルマザンの最大吸収波長 595nm での吸光度からテトラゾリウム塩の最大吸収波長 655nm での吸光度を減じた値で示した。

(B) RPC-C2A 細胞の DNA 合成の変動を、DNA に取り込ませた BrdU に結合するペルオキシダーゼ基質の吸光度で示す。吸光度は、分解したペルオキシダーゼ基質の最大吸収波長 405nm での吸光度から未分解のペルオキシダーゼ基質の最大吸収波長 490nm での吸光度を減じた値で示した。

(C) RPC-C2A 細胞の細胞数の変動を示す。細胞数は培養ディッシュに接着する総細胞数で示した。図中の矢印(↓)は細胞がほぼコンフルエントに達した時期を示す。

図2 RPC-C2A 細胞の TN mRNA 発現に及ぼす成長因子の影響

RPC-C2A 細胞を 10%FBS 含有 EMEM で 48 時間培養した後、1%BSA 含有 DMEM/F-12 培地のみ (control) もしくはこれに 10%FBS または成長因子を加えた培地で 24 時間培養

して、total RNA を抽出し RT-PCR の試料とした。

- (A) RT-PCR 法によって得られた TN および G3PDH の cDNA の電気泳動像を示す。TN は 403 bp, 内部標準として用いた G3PDH は 983 bp の単一バンドとして検出された。右端レーンには 100 bp DNA ladder marker を, 右から 2 番目のレーン (no template) では cDNA テンプレートを添加しないで行った RT-PCR 産物を泳動した。
- (B) TN mRNA の相対発現量。TN バンド濃度を G3PDH に対する相対比として表し, コントロールを 1 として表示した。

図 3 RPC-C2A 細胞の TN 蛋白発現に及ぼす成長因子の影響

図 2 での実験と同様に成長因子を 24 時間添加した後, TN 蛋白のウェスタンブロッティング分析を行った。TN 蛋白は分子量約 250 kDa の位置に検出された。左側の数値は分子量マーカーから得られた分子サイズの位置。

図 4 RPC-C2A 細胞の FN mRNA 発現に及ぼす成長因子の影響

図 2 と同様の条件下で得た RNA を用いて RT-PCR を行い, 得られた FN cDNA の電気泳動像を示す。FN は 344 bp の単一バンドとして検出された。左端レーンには cDNA テンプレートを添加しない RT-PCR 産物の, 左から 2 番目レーンは 100 bp DNA ladder marker の泳動図である。

図 5 RPC-C2A 細胞の基質接着能に及ぼす成長因子の影響

RPC-C2A 細胞を 48 時間培養，成長因子で 24 時間処理後，「材料ならびに方法」に示す手順で接着実験を行い，2 時間の間に FN でコーティングした 12 well に接着した細胞数をカウントした。

(A) 成長因子で刺激した細胞の FN コーティングプレートへの接着を示す位相差顕微鏡像。(×100)

(B) FN あるいは BSA コーティングプレートに接着した細胞数。■は FN コーティングプレートに接着した細胞を，▨は BSA コーティングプレートに接着した細胞を示す。接着細胞数のデータは位相差顕微鏡視野内の 4 区画から得た接着細胞数の平均値±標準誤差である。(p<.0001*でコントロールに対し有意差あり)

図 6 RPC-C2A 細胞の基質接着能に及ぼす抗 TN 抗体の作用

RPC-C2A 細胞を 48 時間培養し，成長因子を培地に 24 時間添加した後，細胞を抗 TN 抗体で処理し，図 5 の実験と同様に接着実験を行った。

(A) 成長因子で刺激した細胞の FN コーティングプレートへの接着を示す位相差顕微鏡像 (×100)。抗 TN 抗体(-)：抗 TN 抗体を添加しない細胞，抗 TN 抗体(+)：抗 TN 抗体を添加した細胞。

(B) FN コーティングプレートに接着した細胞数。■は，抗 TN 抗体で処理していない細胞を，▨は抗 TN 抗体で処理した細胞を示す。接着細胞数のデータは位相差顕微鏡視野内の 4 区画から得た接着細胞数の平均値±標準誤差である。[p<.0001*で抗 TN 抗体(-)に対し有意差あり]

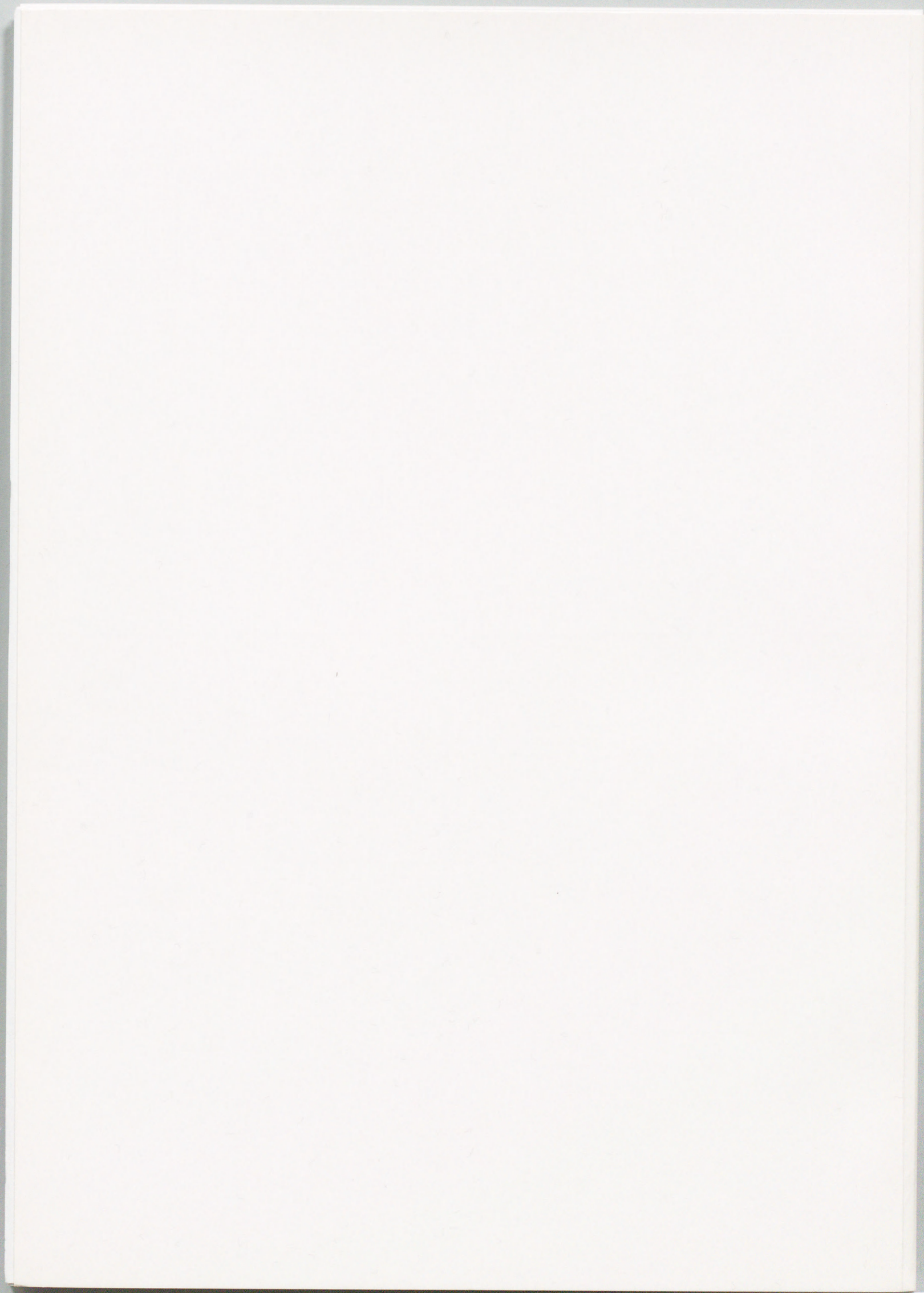
Effects of Growth Factors on Tenascin Expression and its Function in Cultured Dental Pulp Cells

Masumi HORIBE




Department of Periodontology and Endodontology, Tokushima University School of Dentistry

Abstract : Tenascin (TN) is a hexameric glycoprotein of extracellular matrix (ECM) abundant in embryonic mesenchymal tissues. Recent studies have revealed that TN inhibits cell adhesion mediated by fibronectin (FN) to reduce attachment function during organ developing process. Tooth morphogenesis is dependent on epithelial-mesenchymal interactions which are associated with the appearance of TN in dental mesenchymal tissues and dental papillae. Some growth factors are important as potential mediators in epithelial-mesenchymal interactions, including transforming growth factor β 1 (TGF- β), basic fibroblast growth factor (bFGF), epidermal growth factor (EGF), hepatocyte growth factor (HGF), and retinoic acid (RA). These factors are known to be secreted in dental mesenchymal tissues. However, it is unclear how growth factors modulate the anti-adhesive function of TN. The purpose of this study is to clarify the role of TN in dental mesenchymal tissues by investigating the effects of growth factors on TN expression and adhesive function using rat clonal dental pulp cells, RPC-C2A. Analyses of RT-PCR and Western blotting revealed that RPC-C2A cells expressed and synthesized TN mRNA and TN protein, respectively. Although the expression of TN was weak in the control cultures, TGF- β , HGF, and RA increased TN mRNA expression and TN protein amount. The effect of bFGF and EGF was little on TN

expressions. On the other hand, FN mRNA expression was not influenced by any growth factors. To determine the effect of growth factors on cell adhesion onto FN-coated plastic plates, a cell adhesion assay was performed. The cells treated with TGF- β , HGF, and RA showed a marked reduction of attached cells, whereas no effect was observed with bFGF and EGF. When anti TN antibody was added before the assay, the number of adherent cells on the plate recovered to the control level, indicating that TGF- β , HGF, and RA augmented the anti-adhesive function by enhancing TN expression. These findings suggest that TN in dental mesenchymal tissues may possibly function as a modulator of cell adhesion to ECM and that TGF- β , HGF, and RA may be a positive regulator of TN expression of dental pulp and mesenchymal cells.



論文審査の結果の要旨

報告番号	① 乙 歯第 172 号	氏名	堀部ますみ
審査委員	主査	永田 俊彦	
	副査	井上 秀夫	
	副査	松尾 敬志	

題目

培養歯髄細胞におけるテネインの発現と機能に及ぼす成長因子の影響

要旨

器官発生において上皮と間葉組織との相互作用は必須であり、その相互作用は発生段階で分泌される成長因子の作用を介した細胞外基質 (ECM) の発現に依存していると考えられている。とりわけ ECM 蛋白のうちテネイン (TN) は細胞の接着機能を調節することにより組織の構築に関与している。歯胚の間葉組織においても発生段階で TN の発現が変動することが知られているが、成長因子による TN 発現の変動に伴う機能調節やその機構に関する情報は少ない。本研究では、培養歯髄細胞における TN の発現に及ぼす成長因子の影響を調べるとともに、TN の細胞接着における機能を検討することによって、TN の歯胚間葉組織における生理的意義を追求した。ラット株化歯髄細胞 RPC-C2A 細胞における TN mRNA および蛋白の発現は、transforming growth factor β 1 (TGF- β), hepatocyte growth factor (HGF), retinoic acid (RA) で刺激した細胞では増強していたが、basic fibroblast growth factor (bFGF), epidermal growth factor (EGF) で刺激した細胞では変化がなかった。一方、フィブロネクチン (FN) mRNA の発現はどの成長因子で刺激しても変化はなかった。また、FN で表面処理した培養ディッシュへの接着細胞数を検討した結果、TGF- β , HGF, RA 刺激では対照群と比べて減少しており、bFGF, EGF 刺激では対照群とほぼ同数であった。すなわち、TGF- β , HGF, RA で刺激した細胞では、TN の発現が亢進するとともに、細胞接着が低下していた。このことから TN が細胞接着を阻害している可能性が示された。次に、細胞を抗 TN 抗体で前処理し同様の実験を行ったところ、接着細胞数はいずれの成長因子で刺激した場合も一様に対照群とほぼ同程度にまで回復した。これらの結果から RPC-C2A 細胞が FN を介して接着する際に、TN は阻害機能を有していることが明らかとなった。

以上より、歯髄細胞の TN 発現は成長因子により制御されており、歯髄組織における TN は FN と拮抗して細胞接着を阻害していること、および成長因子による TN 発現の増減を介して細胞接着が調節されていることが示唆された。これらの成果は、歯髄組織における TN の発現と機能、ならびに成長因子の影響を明らかにするとともに、歯胚間葉組織における発生機構の研究分野に新たな知見を与え、歯学の発展に大いに貢献するものである。よって、本論文は博士 (歯学) の学位授与に値すると判定した。

